

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791071

研究課題名(和文)川崎病類似冠動脈炎モデルマウスを用いた川崎病罹患後の動脈硬化のメカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of progression of atherosclerosis after Kawasaki disease by coronary arteritis mouse model

研究代表者

田中 珠美 (Tanaka, Tamami)

九州大学・大学病院・研究員

研究者番号：60423547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Nod1リガンド投与によりApoEノックアウトに冠動脈炎を発症させ、その後の動脈硬化の進展について検討を行った。冠動脈炎を惹起したマウスにおいて動脈硬化の進行を認め、このNod1リガンドはマウス冠動脈のCcl5やCxcl16といったサイトカイン・ケモカインを誘導し、動脈硬化を悪化していることがわかった。さらに、このNod1と動脈硬化の関連性を示すため、Nod1・ApoEダブルノックアウトマウスで検討を行ったところ、ApoEノックアウトマウスと比較して、動脈硬化は抑制された。以上から川崎病発症を来すような自然免疫リガンドは動脈硬化を進行させる可能性があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Nod1 ligand induces Kawasaki disease-like coronary arteritis in mice. After coronary arteritis developed in ApoE KO mice by administration of Nod1 ligand, the progression of atherosclerosis was assessed. Atherosclerosis in coronary arteritis-induced ApoE KO mice progressed more than in not-induced ApoE KO mice. And the progression was caused by production of cytokines and chemokines like Ccl5 and Cxcl16 in coronary artery. Furthermore, atherosclerosis in Nod1/ApoE double knockout mice progressed more slowly than that in ApoE KO mice. These findings suggested that innate immune ligands possibly caused by Kawasaki disease would progress atherosclerosis.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：川崎病 自然免疫 動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

1967年に川崎病が発見されて40年以上経過しており、当初小児であった患者は現在動脈硬化などの心血管系疾患好発年齢へと近づいてきており、急性期の治療が確立してきた今、その長期 QOL について着目しなければならないと考える。実際、川崎病罹患の既往がある成人では動脈硬化が促進されることが知られている。しかし、川崎病に罹患することでなぜ動脈硬化が促進するかについては全く解明されておらず、その対策についても検討されていなかった。

そんな中、我々は自然免疫系 Nod1 のリガンドを用いて、川崎病類似の部位特異的血管炎マウスモデルを完成させた。川崎病の原因として様々な細菌、ウイルスなどが報告されたものの、共通の物質が見つかっていなかった中、様々な細菌から放出される Nod1 リガンドにより川崎病類似冠動脈炎が発症する報告であり、川崎病の病因論に一石を投じる結果であった。

また、自然免疫と動脈硬化については Toll-like receptor 4 があるものの、他の自然免疫系リガンドについてはほとんど報告されておらず、本モデルで使用する Nod1 リガンドの動脈硬化の影響は新たなインパクトを与えると考えられた。

## 2. 研究の目的

川崎病遠隔期における動脈硬化の進展について本モデルを用いて解析し、さらに動脈硬化の発症における自然免疫系 Nod1 リガンドの役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 川崎病類似冠動脈炎モデルの動脈硬化の進展についての検討

LPS 20 $\mu$ g を腹腔内投与し、翌日から6日間 Nod1 リガンド 100 $\mu$ g 口腔内投与を行い、計1週間で川崎病類似冠動脈炎を誘導させる。まず、ヒト動脈硬化モデルである ApoE ノックアウトマウス(普通食)を用いて、冠動脈炎が発症するかについて検討を行った。

動脈硬化病変を認めない5週齢~9週齢の ApoE ノックアウトマウス(普通食)を用いて、まず5週齢で冠動脈炎が発症したあと、そのまま経過観察を行い、冠動脈炎を消失させ、9週目に動脈硬化などの病理学的変化について検討を行った。

(2) 動脈硬化の進展における Nod1 リガンドの影響

冠動脈炎発症に伴い動脈硬化が進行するが、Nod1 リガンド自体が血管に対してどのような影響を与えるかについて、検討を行った。

まず、ApoE ノックアウトマウス(普通食)に Nod1 リガンドを入れた水を飲水させて、冠動脈炎が発症しない濃度を確認した。その濃度において、5週齢から9週齢の4週間飲

水させ、動脈硬化が増悪するかについて検討を行った。

(3) 本モデルにおける動脈硬化の進展に関する遺伝子群の検索

ApoE ノックアウトマウス Nod1 リガンドを内服させて、そのマウスの大動脈弁を実体顕微鏡下で摘出し、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の状況を確認し、特に有意な上昇を認める遺伝子については、その大動脈弁での発現を確認すべく、定量 PCR での解析を行った。

さらに、そのサイトカイン・ケモカインの抗体を用いて、抑制実験を行い、動脈硬化の進行について検討を行った。

(4) Nod1・ApoE ダブルノックアウトマウスでの動脈硬化進行の検討

Nod1 ノックアウトマウスと ApoE ノックアウトマウスを掛け合わせ、Nod1・ApoE ダブルノックアウトを作成した。

このマウスと ApoE ノックアウトマウス(普通食)との動脈硬化の進行についての検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 川崎病類似冠動脈炎モデルの動脈硬化の進展についての検討

まず、ApoE ノックアウトマウスで冠動脈炎が誘導されるかについて検討を行ったところ、Wild type マウスと同様に冠動脈炎を発症した。

そこで、無投与群および冠動脈炎発症群で比較したところ、無投与群では動脈硬化病変はほとんどないのに対し、冠動脈炎発症群では有意に動脈硬化病変が増加していた(図1)。

以上から、冠動脈炎の発症が動脈硬化進行を早める可能性があることが示唆された。

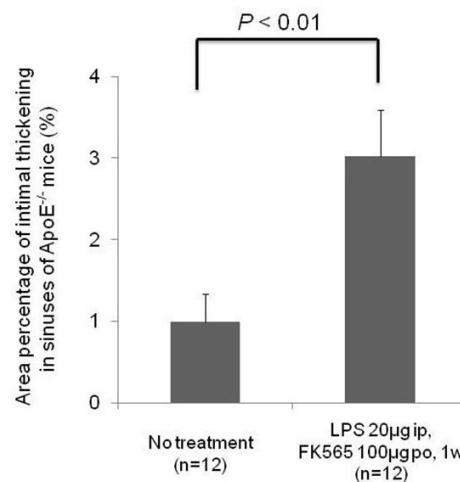
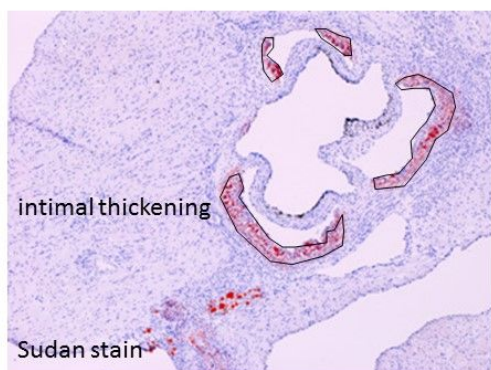


図1 ApoEノックアウトマウスでの川崎病類似冠動脈炎発症後の動脈硬化進行の検討

(2) 動脈硬化の進展における Nod1 リガンドの関連の解明



ApoE<sup>-/-</sup> mouse, 9w, Nod1 ligand 49.9μg p.o.

図2 ApoEノックアウトマウスでの Nod1リガンド投与による動脈硬化の進行の検討

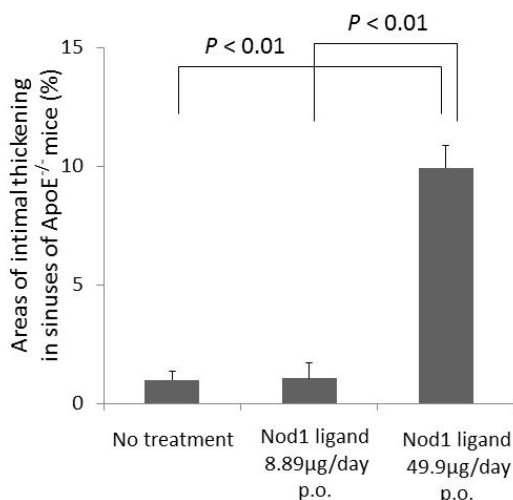


図3 ApoEノックアウトマウスでの Nod1リガンド投与による動脈硬化の進行結果

ApoE ノックアウトマウスに Nod1 リガンドを入れた水を飲水させ、冠動脈炎が発症しないかについて、さらに動脈硬化の進行について検討を行ったところ、結果的に 49.9μg/day 内服しているマウスで冠動脈炎は発症せず、さらに Nod1 リガンド無投与群と比べて、有意に動脈硬化病変の増加を認めた(図2、図3)。以上から、Nod1 リガンド自体が血管に作用し、動脈硬化への影響を与えることが分かった。

しかし、飲水での実験では徐々に飲水量が減ってきて、Nod1 リガンド投与量が安定して維持できないことが分かったため、Nod1 リガンドの飲水ボトルでの投与実験は不適当とし、口腔内への一定量の投与による実験へと切り替えた。

Nod1 リガンドの口腔内投与を2日間行い、休薬期間を5日とし、これを1週間のスケジュールとした。5週齢の ApoE ノックアウトマウスに対して4週間行い、9週齢で病理学

的評価を行うこととした。Nod1 リガンド 50μg で冠動脈炎は発症せず、動脈硬化の進行を確認でき、今後はこのスケジュールで実験を行うこととした。

(3) 本モデルにおける動脈硬化の進展に関する遺伝子群の検索

ApoE ノックアウトマウスに Nod1 リガンドを経口投与し、大動脈弁およびその周囲を摘出し、マイクロアレイ解析を行ったところ、Ccl5、Cxcl16などのサイトカイン・ケモカインが高発現していることがわかった。さらに、組織の定量 PCR を行い、それらのサイトカイン・ケモカインが上昇していることが確認できた。

最も高発現していた Ccl5 に着目し、抗 Ccl5 抗体による抑制実験を行った。すると、抗 Ccl 抗体投与により、Nod1 リガンドによる動脈硬化の進行は抑制された。

(4) Nod1・ApoE ダブルノックアウトマウスでの動脈硬化進行の検討

Nod1 ノックアウトマウスと ApoE ノックアウトを掛け合わせ、遺伝子発現を確認した上で、Nod1・ApoE ダブルノックアウトマウスと普通食で飼育した。

すると、Nod1・ApoE ダブルノックアウトマウスでは、ApoE ノックアウトマウスと比較して、早期の動脈硬化の進行が抑制されるが、週数が経過するにつれて、その差は小さくなった。

以上から、自然免疫 Nod1 は動脈硬化の早期に大きく影響を与え、週数が経過すると他の要素が強くなり、Nod1 の動脈硬化への影響は少なくなることが明らかとなった。この結果は Nod1 と動脈硬化との関連性についての初の知見であり、さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 珠美 (TANAKA TAMAMI)

研究者番号：60423547

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし